

CLIPPEDIMAGE= JP359203957A
PUB-NO: JP359203957A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 59203957 A
TITLE: REAGENT FOR MEASURING ALPHA2 -MACROGLOBULIN BOUNDABLE
CALLICREIN
ACTIVITY

PUBN-DATE: November 19, 1984

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

HAYAKAWA, SHINOBU

HIRANO, KASUYUKI

SUGIURA, MAMORU

INT-CL (IPC): G01N033/54; A61K039/44 ; C12Q001/00

US-CL-CURRENT: 435/4,435/7.4

ABSTRACT:

PURPOSE: To enable measurement of the
α<SB>2</SB>-macroglobulin bondable
callicrein activity in a human bodily fluid by using an
insolubilized carrier
formed by covalent bond of an anti
α<SB>2</SB>-macroglobulin antibody and
a substrate specific to callicrein as a reagent.

CONSTITUTION: An insolubilized antibody formed by sensitizing the
α<SB>2</SB>-macroglobulin (α<SB>2</SB>-MG) refined
from a human
blood plasma to a house rabbit, and obtaining the refined anti
α<SB>2</SB>-MG antibody refined from the antiserum thereof
by covalent
bond or physical adsorption together with a polystyrene bead,
etc. is prep'd.
Said antibody and a synthetic substrate
L-prolyl-L-phenylalaninyl-L-alginyll-
4-methylcumaryl-7-amide having high specifichness with callicrein
are brought
into reaction with the blood plasma to be examined for about one
hour at about
37°C, and the fluorescent intensity is measured at 380nm
excitation
wavelength and 440nm fluorescence wavelength. The activity of
the
α<SB>2</SB>-MG.callicrein conjugate in the blood plasma is
thus measured
with good accuracy and is made useful in the diagnosis of the
heptocirrhosis
and subacute hepatitis.

COPYRIGHT: (C)1984,JPO&Japio

DID:

JP 59203957 A

DERWENT-ACC-NO: 1985-003474

DERWENT-WEEK: 198501

\~4-COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD\~14~

TITLE: Reagent for diagnosis of liver disease - comprises

anti-alpha 2

macro globulin antibody that absorbs kallikrein binding alpha 2

macro-globulin

INVENTOR-NAME:

PRIORITY-DATA: 1983JP-0078157 (May 6, 1983)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO

PUB-DATE

LANGUAGE

PAGES

MAIN-IPC

JP 59203957 A

November 19, 1984

N/A

004

N/A

INT-CL (IPC): A61K039/44; C12Q001/00 ; G01N033/54

ABSTRACTED-PUB-NO: JP59203957A

BASIC ABSTRACT: Reagent for measurement of

alpha2-macroglobulin-binding

kallikrein activity consists of insoluble antibody and

kallikrein-specific

substrate is new. The insoluble antibody is

anti-alpha2-macroglobulin antibody

obtd. with purified alpha2-macroglobulin as antigen and bound to insoluble

carrier by covalent bonding or physical adsorption. Sensitize the

alpha2-macroglobulin is purified from human plasma to rabbit to prepare

antiserum and purified by ammonium sulphate fractionation and DEAE-cellulose to

prepare antibody. Then combined with polystyrene beads by

physical adsorption

or to glass beads and nylons bead by covalent bonding.

Kallikrein-binding

alpha2-macroglobulin in plasma is adsorbed to the insoluble

antibody. The

insoluble antibody is washed to remove contaminated protein.

Adsorbed

kallikrein-binding alpha2-macroglobulin is measured by

L-prolyl-L-phenylalanyl

-L-arginyl-4-methyl coumaryl-7-amide, which is synthesised

substrate with high

specificity to kallikrein. Patients with liver disease show

specifically low

level of kallikrein-binding alpha2-macroglobulin.

USE/ADVANTAGE - The reagent is useful for measurement of

alpha2-macroglobulin
in plasma of patient who is suspected of having liver diseases,
and therefore
is useful for diagnosis of liver diseases.

TIX:

Reagent for diagnosis of liver disease - comprises anti-alpha 2
macro-globulin
antibody that absorbs kallikrein binding alpha 2 macro-globulin

ABTX:

Reagent for measurement of alpha2-macroglobulin-binding
kallikrein activity
consists of insoluble antibody and kallikrein-specific substrate
is new. The
insoluble antibody is anti-alpha2-macroglobulin antibody obtd.
with purified
alpha2-macroglobulin as antigen and bound to insoluble carrier by
covalent
bonding or physical adsorption. Sensitize the
alpha2-macroglobulin is
purified from human plasma to rabbit to prepare antiserum and
purified by
ammonium sulphate fractionation and DEAE-cellulose to prepare
antibody. Then
combined with polystyrene beads by physical adsorption or to
glass beads and
nylons bead by covalent bonding. Kallikrein-binding
alpha2-macroglobulin in
plasma is adsorbed to the insoluble antibody. The insoluble
antibody is washed
to remove contaminated protein. Adsorbed kallikrein-binding
alpha2-macroglobulin is measured by L-prolyl-L-phenylalanyl
-L-arginyl-4-methyl
coumaryl-7-amide, which is synthesised substrate with high
specificity to
kallikrein. Patients with liver disease show specifically low
level of
kallikrein-binding alpha2-macroglobulin.

TTX:

REAGENT DIAGNOSE LIVER DISEASE COMPRISE ANTI ALPHA MACRO GLOBULIN
ANTIBODY
ABSORB KALLIKREIN BIND ALPHA MACRO GLOBULIN

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—203957

⑬ Int. Cl.³
G 01 N 33/54
A 61 K 39/44
C 12 Q 1/00

識別記号

庁内整理番号
H 7906—2G
7043—4C
8213—4B

⑭ 公開 昭和59年(1984)11月19日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑮ α_2 -マクログロブリン結合性カリクレイン
活性測定用試薬

⑯ 特 願 昭58—78157

⑰ 出 願 昭58(1983)5月6日

特許法第30条第1項適用 昭和58年3月10日
発行社団法人日本薬学会「日本薬学会第103
年会講演要旨集」において発表

⑱ 発 明 者 早川忍

愛知県西春日井郡師勝町大字久
地野字権現92—1

⑲ 発 明 者 平野和行

岐阜市華陽町1丁目18番地の1

⑳ 発 明 者 杉浦衛

江南市古知野町久保見5番地

㉑ 出 願 人 株式会社スギウ新薬開発研究
所

江南市古知野町久保見5番地

㉒ 出 願 人 マルコ製薬株式会社

名古屋市西区児玉一丁目5番17
号

㉓ 代 理 人 弁理士 原田信市

明 細 書

1 発明の名称

α_2 -マクログロブリン結合性カリクレイン活性測定用試薬

2 特許請求の範囲

1. 精製した α_2 -マクログロブリンを抗原として得られる抗 α_2 -マクログロブリン抗体を共有結合または物理的吸着により不溶性担体に結合した不溶化抗体と、カリクレインに特異的な基質とからなることを特徴とする α_2 -マクログロブリン結合性カリクレイン活性測定用試薬。

3 発明の詳細な説明

本発明はヒト体液中の α_2 -マクログロブリン(以下 α_2 -MG と称す)に結合した血漿カリクレイン活性を特異的に測定する試薬に関する。

本発明の試薬は肝疾患の疑いのある患者の血漿中の α_2 -MG 結合性カリクレインを測定するのに有用であり、従って肝疾患の診断に有用である。

血漿カリクレインがヒト血清中 α_2 -マクログロブリンと結合することは知られているが α_2 -マクログロブリンに結合したカリクレイン活性の特異的測定方法は確立されていない。そこで今回本発明者らは抗 α_2 -MG 抗体の特異性を利用し体液中より α_2 -MG および α_2 -MG 結合物を分離し、次にカリクレインに特異的な基質と反応させることにより、 α_2 -MG 結合性カリクレイン(以下 α_2 -MG-K と称す)活性の特異的測定法を確立することを見出し本発明を完成した。

本発明の試薬は次のようにして製造することができる。即ち、ヒト血漿より精製した α_2 -MG を家兎に感作し抗血清を作製し、硫酸分画、DEAE-cellulose により精製し抗体とした。この抗体をポリスチレンビーズには物理的吸着により、またガラスビーズおよびナイロンビーズについては共有結合により結合し、抗体結合不溶性担体を調製した。

この不溶化抗体を用い、血漿中より α_2 -MG-K を特異的に吸着した後、この不溶化抗体を洗浄し他の交雑タンパクを除き、吸着している α_2 -MG-K 活性をカリクレインに特異性の高い合成基質である L-プロリール-L-フェニルアラニール-L-アルギニン

ニル-4-メチルアミラー-7-アミドにより測定するものである。

肝疾患患者血漿の α_2 -MG-K活性を測定したところ健康人に比べ、特異的に α_2 -MG-K活性が低下することが判明した。

したがって、本発明物質は肝疾患の診断に有用である。

次に実施例をあげて本発明を詳細に説明する。
実施例

(1) α_2 -MG 抗体の作製

α_2 -MG 2mgを含む溶液1mlを Freund のコンブリート・アジュバント (complete adjuvant) 1ml を混合して作製した乳剤を家兎1匹に対して背中の皮下および四肢の爪の間に注射した。第1回目の免疫から2週間後に第1回目と同様の乳剤を家兎の皮下に注射した。同様の免疫操作を5回繰り返した後、家兎の動脈より血液を採取し、37℃で30分間の加温後、3,000rpmで15分遠心を行い血漿を得た。この血漿を56℃で30分熱処理を行って補体

で2時間振とうした。抗体溶液を除いた後、0.1%ウシ血清アルブミンを含む上記リン酸ナトリウム緩衝液でビーズを洗浄後、同緩衝液を加え、さらに30℃で2時間振とうした。さらに同緩衝液で洗浄後、濃度が0.1%になるようにブジ化ナトリウムを加え、同一緩衝液中にビーズを保存した。

(3) 抗 α_2 -MG 抗体結合ガラスビーズの調製

ガラスビーズ(直径約4mm)5,000~10,000個を10%アミノプロピル・トリエトキシランを含むトルエン溶液200mlに加え30分間室温で反応後、上記溶液をガラスフィルターにて除去し、トルエンにて充分洗浄後、アルキルアミン化ガラスビーズを乾燥した後、0.2%抗 α_2 -MG抗体を含有する20mMリン酸緩衝液(PH7.4)500ml中に加えた後、よく攪拌しながらグルタルアルデヒドを終濃度0.1~1%になるように加え、4℃にて12時間振とう反応させた。

ここで得られた抗 α_2 -MG抗体結合ガラスビーズを0.1%ウシ血清アルブミンを含有する0.1Mリン酸ナトリウ

ムの非動化を行い、20mMリン酸緩衝液(PH8.0)を血漿と同量加え、次いで血漿と同容量の飽和硫酸アンモニウムを加えて33%飽和とし、そこで析出する沈殿を12,000rpmで15分間の遠心を行って集め、少量の上記リン酸緩衝液に溶解後、同緩衝液を用いて透析を行い、硫酸アンモニウムを完全に除いた。ここで得られた画分を20mMリン酸緩衝液(PH8.0)により緩衝化されたDEAE-セルロースカラム(2.5×15cm)に添加し、カラムに吸着せず上記緩衝液により流出する画分を集め、20mg/mlのタンパク量になるように上記緩衝液で希釈し、これを抗 α_2 -MG抗体とし、それぞれを分注し、凍結乾燥し-30℃で保存した。

(2) 抗 α_2 -MG 抗体結合ポリスチレンビーズの調製

凍結乾燥した抗体40mgを50mM塩化ナトリウムを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(PH7.0)400mlに溶解し、この溶液中に、充分洗浄(強力な洗剤等を用いて)したポリスチレンビーズ(直径約6.5mm)を1,000~10,000個加え、30

ウム緩衝液(PH7.0)にて充分に洗浄した後、0.1%ブジ化ナトリウムを含む同上緩衝液500ml中にて4℃で保存した。

(4) 抗 α_2 -MG 抗体結合ナイロンビーズの調製

ナイロンビーズ(直径約3mm)1,000~10,000個を12.5%トリエチル・オキシニウム・テトラフルオロボレートを含むジクロメタン溶液100mlに加え25℃で15分間反応後、水酸化カルシウムで水分を除いたジクロロメタン500mlにて洗浄した。上記0-アルキル化ナイロンビーズをジクロメタン100ml中に加えて、室温で2時間反応後、0.2Mホウ酸緩衝液(PH8.5)にて500mlにて洗浄後、5%グルタルアルデヒドを含む同上緩衝液100ml中に加えて室温で15分反応させた。このビーズをさらに20mMリン酸カリウム緩衝液(PH7.0)500mlで洗浄後、1mg/mlの抗体を含む上記ホウ酸緩衝液500ml中に加え、4℃で一夜反応を行い、0.1%ウシ血清アルブミンと0.1%ブジ化ナトリウムを含む20mMリン酸カリウム緩衝液(PH7.0)で充分洗浄した後、同上緩衝液中4℃で保存した。

実験例1

(1) 抗 α_2 -MG抗体ポリスチレンビーズを用いる方法

測定対象試料1 μ Lを200 μ Lの0.5%ゼラチン、0.1%ウシ血清アルブミン、0.01%チオメルサル、0.3M塩化ナトリウムを含む10mMリン酸緩衝液(PH 7.0)を加えて、前記(2)で得られた抗体結合ポリスチレンビーズをそれぞれ1個加え、37℃で3時間反応後、室温にて一夜放置した。次に2 μ Lの0.05%Tween 20、0.15M NaClを含む^(10mM)リン酸ナトリウム緩衝液(PH 7.4)にて2回洗浄した。このビーズに200 μ Lの0.1M Tris-HCl緩衝液(PH 8.2)および10 μ Lのレープロリール・レーフェニルアラニン-L-アルギニン-4-メチルアラニン-7-アミド(ジメチルスルホキシドにより10mMとしたもの)を加え、37℃で1時間反応後、0.4M酢酸緩衝液(PH 4.0)を2.0 μ L加え、励起波長380nm、発光波長440nmにて発光測定し、 α_2 -MG-K活性を測定した。

(2) 抗 α_2 -MG抗体結合ガラスビーズを用いる方法

前記(1)で調製した抗 α_2 -MG抗体結合ガラスビ-

1. 各検体の同時再現性は5種の濃度の異なる検体の10回繰り返し実験を行った結果である。
2. 各検体の日差変動は5種の濃度の異なる検体を10日間繰り返し実験を行った結果である。

各種疾患患者血漿中の α_2 -MG-K活性の本測定法による測定結果

各種疾患患者血漿中の α_2 -MG-K活性を図に示した。図中、()内の数字は症例数を表わす。この結果、血漿中で α_2 -MG-K活性は肝硬変、亜急性肝炎で特異的に低下していた。

4 図面の簡単な説明

図は本発明の試薬を用いた各種疾患患者の血漿の α_2 -MG-K活性量を示すグラフである。

特許出願人 株式会社スギウラ新薬開発研究所
代理人 井理士 原 田 信 市

ズを使用する以外は実験例(1)と同様に操作を行った。

(3) 抗 α_2 -MG抗体結合ナイロンビーズを用いる方法

前記(4)で調製した抗 α_2 -MG抗体結合ナイロンビーズを使用する以外は実験例(1)と同様に操作を行った。

各実験例における血漿検における同時再現性(同一試料を同時に測定したときのバラツキの度合)および日差変動(日をかえて同一試料を測定したときのバラツキの度合)を表に示す。

表 抗 α_2 -MG抗体結合担体を用いた α_2 -MG-K活性測定法の再現性

C.V %	測 定 系					
	ポリスチレン		ガラス		ナイロン	
	同時 ¹	日差 ²	同時 ¹	日差 ²	同時 ¹	日差 ²
血漿	4.0	6.3	3.9	8.5	6.0	7.9

C.V %: 変動係数 (coefficient of variation)

$$C.V = \frac{\text{標準偏差}}{\text{平均値}} \times 100 \%$$

